

## 病態動物에서의 藥物의 Hepatic Clearance에 관한 研究 I

病態家兔에서의 Bromphenol Blue의 肝膽輸送

禹 鍾 鶴 · 金 信 根 · 李 民 和 · 韓 建

서울대학교 藥學大學

### Hepatic Drug Clearance of Animal in Disease States I

#### Hepato-biliary Transport of Bromphenol Blue in Acute CCl<sub>4</sub> Intoxicated Rabbits

Chong Hak Woo, Shin Keun Kim, Min Hwa Lee and Kun Han

(Received Feb. 10, 1980)

Bromphenol blue (BPB) was studied with rabbits in normal and disease states to understand the basic principles of hepato-biliary transport process, and the effect of disease states on the drug disposition.

The time course of plasma concentration and of biliary excretion was studied in normal and CCl<sub>4</sub> intoxicated rabbits.

A conspicuous retention of BPB clearance from the plasma was observed, and the slope of the first-phase of plasma curve was decreased in the intoxicated rabbits.

The shape of biliary excretion was same in normal and intoxicated states, but the amount of BPB excreted into bile in the intoxicated states was much smaller than in normal states.

A relationship was found which enables one to predict the pattern of uptake of BPB by the liver, and the pattern of excretion into the bile in normal states, but was not in CCl<sub>4</sub> intoxicated states.

It may be that the application of this experiments would extend the effect of disease states on the drug disposition.

\* College of Pharmacy, Seoul National University

본 論文은 1979年度 文敎部 學術研究 助成費에 의하여 研究된 것임.

肝臟은 藥物代謝의 major site로서 病的狀態에서는 藥物의 hepatic dysfunction에 따른 drug disposition은 영향을 받게 된다. 特히 hepatic disease에서는 藥物의 blood로부터의 liver uptake와 liver에서 bile로의 輸送等 hepatic transport는 큰 영향을 받는다<sup>1)</sup>.

Combes<sup>2)</sup>는 BSP가 bile로 배설될 때 glycine 및 glutamic acid와 conjugate 된다고 報告하였고 Takada<sup>3)</sup> 등은 藥物의 hepato-biliary transport의 生物藥劑學的 研究에서 BSP는 metabolic reaction으로 因해 model compound로는 적절치 못하다고 지적하였고 non-metabolizing organic anionic compound로 BPB를 選擇하여 hepatic excretion을 3단계의 mechanism으로, 즉, ① liver parenchymal cells에서의 uptake ② intracellular transport

③ liver parenchymal cells로부터 bile canaliculi로 배설하는 것으로 생각하였다.

Arias<sup>4)</sup> 등은 hepatic cytoplasmic protein fractions, X, Y, Z를 分離하였고 이 protein들이 hepatic transport에 重要的 역할을 함을 報告하였다. Combes<sup>5)</sup> 등은 BSP와 glutathione (GSH)의 conjugating process가 BSP의 plasma로부터 bile로의 transport에서 rate limiting step임을 報告하였으며 Jakoby<sup>6)</sup> 등은 glutathione S-transferase를 AA, A, B, C, D, E의 6種으로 分類하였고 Habig<sup>7)</sup> 등은 그中 glutathione S-transferase B가 BSP의 main binding protein인 ligandin임을 究明하였다.

Iga<sup>8)</sup> 등은 病的狀態下的 BSP의 hepatic transport에서 initial plasma disappearance는 hepatic blood flow에 의하여 一次的 영향을 받으며, Y-fraction의 binding activity의 감소가 liver의 BSP uptake 감소를 說明한다고 報告하였다.

또한 最近 Suyama<sup>9)</sup> 등은 chronic CCl<sub>4</sub> intoxicated rats에서 BSP에 對한 Y-fraction의 binding ability가 50%以上 감소하였고 Y-fraction의 enzyme content 감소로 conjugating ability가 감소하였다고 報告하였다.

Liver disease에서 pharmacokinetic parameter의 變化를 가져오는 藥物들이 報告되고 있다<sup>1)</sup>. 著者들은 肝臟환劑가, hepatic transport, 藥物의 hepatic transport에서 重要的 역할을 하는 hepatic cytoplasmic protein fractions X, Y, Z에 미치는 영향에 對한 研究를 위해 우선 model compound로서 BPB를 使用하여 acute CCl<sub>4</sub> intoxicated rabbit에서의 BPB의 hepatic transport에 關한 知見을 얻었기에 報告하는 바이다.

## 實 驗 方 法

試藥 및 試料—GOT, GPT 測定用 試藥(和光純藥工業株式會社), BSP 測定試藥(MERCK). BPB(鳥久 特級試藥). sodium pentobarbital(MERCK). 其他 試藥은 市販 特級試藥을 使用하였다.

BPB 液—BPB 167.5mg에 ethyl alcohol 5ml, 증류수 45ml를 加하여 3.35mg/ml 液을 만든다.

sodium pentobarbital 液—sodium pentobarbital 1g에 증류수 20ml를 加하여 1g/20ml 液을 만든다.

實驗動物—2.5~3kg의 健康한 숫토끼를 使用했다.

動物前處理—動物은 正常群과 disease state 群으로하여 disease state 群은 CCl<sub>4</sub> 0.3ml/kg을

근육주사하여 24시간 경과後 實驗했다.

**GOT, GPT 測定**—Reitman · Frankel 法變法인 日本消化器學會肝機能研究班法<sup>10)</sup>으로 測定하였다.

**BSP 測定**—Mateer<sup>11)</sup>의 方法으로 測定하였다.

**檢量曲線의 作成**—BPB 6.6997mg을 精秤하여 증류수 100ml에 녹여 10<sup>-4</sup>M BPB를 만들고 다시 그 液 0.25, 0.5, 1, 2, 3ml를 取하여 各各 10倍 희석하여 Coleman Spectrophotometer를 使用하여 波長 600nm에서 測定하였다.

**血液 및 膽汁採取方法**—實驗動物을 ethyl ether로 premedication한 後 sodium pentobarbital을 복강注射한다. 대퇴부동맥과 bile duct를 polyethylene tube로 cannulation하고 BPB를 10μmole/kg 정맥注射한다. 一定時間간격으로 血液 및 膽즙을 채취한다.

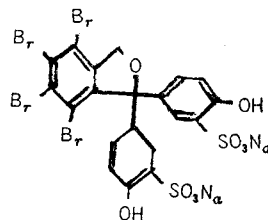
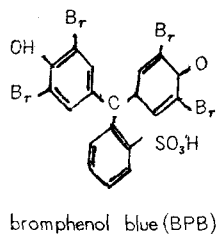
**分析方法**—BPB in plasma: 血液 5ml를 取하여 3000 r.p.m에서 30分間 원심분리시키고 血清 2ml를 取하여 1N HCl 1ml iso-amyl alcohol 6ml를 加하고 15分間 shaking한 後 3000 r.p.m에서 15分間 원심분리한다. iso-amyl alcohol 層에서 3ml를 取하여 pH 10 carbonate buffer solution 5ml를 加하여 15分間 shaking한 後 3000 r.p.m에서 15分間 원심분리하여 600nm에서 吸光度를 測定한다.

BPB in Bile: 膽즙을 pH 7.4 phosphate buffer로 희석하여 600nm에서 吸光度를 測定한다

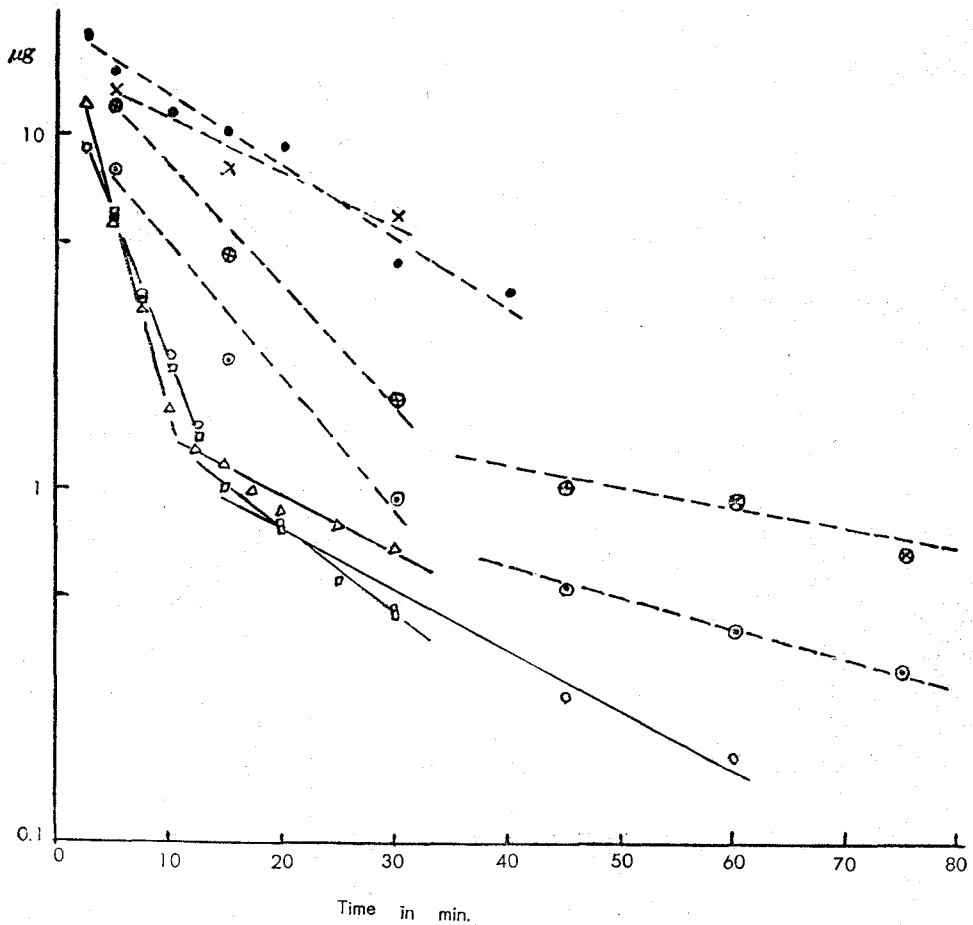
BPB in Liver: liver 4g을 取하여 pH 7.4 phosphate buffer 8ml를 加하고 homogenize한다. homogenate 5ml를 取하여 acetone 6ml를 加하고 15分間 shaking한 後 3000 r.p.m에서 20分間 원심분리한다. 상등액 6ml를 取하여 3000 r.p.m에서 10分間 원심분리한다. 상등액 4ml에 chloroform 0.1ml를 加하여 600nm에서 吸光度를 測定한다.

### 結果 및 考察

肝機能損傷의 實驗的 model로서 CCl<sub>4</sub> hepatotoxicity는 널리 使用되어 왔고 plasma의 BSP retention이 肝機能진단의 重要한 지표라는 것은 잘 알려진 事實이며 이와 함께 plasma transaminase activity (GOT · GPT)는 肝의 代謝能의 지표로서 臨床적으로 重要하며 Giorgi<sup>12)</sup> 등은 CCl<sub>4</sub> intoxicated rats에서 plasma와 bile 중의 BSP kinetics는 four-compartment model에 適合하다고 報告하였고 Klaassen<sup>13)</sup> 등은 CCl<sub>4</sub>가 BSP의 代謝·저장 및 배설에 미치는 영향에 對한 報告를 하였다.



BPB(mol. wt = 670.02)는 BSP(mol. wt = 838.05)와 같이 各各 sulfonic acid group을 갖고 있으며 이런 有機 anion 化合物은 共通의 肝atic transport system을 갖고 있다고 생



**Figure 1**—Plasma elimination curves of BPB in normal and disease states. Key : —□—, —○—, —△—, Normal; ●●● (GOT; over 2000, GPT; over 2000), ××× (GOT; over 2000, GPT; over 2000), ⊗⊗⊗ (GOT; 540, GPT; 650), ⊙⊙⊙ (GOT; 62, GPT; 73), Disease

각된다<sup>3)</sup>.

Fig. 1은 Bromphenol blue ( $10\mu$  mole/kg)을 귀정맥에 注射한 後 血中の BPB농도의 經時變化를 semilogarithmic plot한 것이다. 이 graph는 slope가 變하는 두 개의 phase로 構成되어 있으며  $C_x = Ae^{-K_1t} + Be^{-K_2t}$ 의 式으로 나타낼 수 있다.<sup>14)</sup> 여기서  $C_x$ 는  $t$ 時間에서의 血中濃度,  $K_1$ 과  $K_2$ 는 graph의 2개의 기울기이다. BPB 정맥주사後 graph의 first phase는 plasma로부터 liver의 BPB uptake가 BSP에서처럼 急速히 일어남을 추측할 수 있다.<sup>15)</sup>

GOT:62, GPT:73의 moderate 病態群에서는 正常群보다 first phase의 기울기  $K_1$ 이 감소하였으며 liver damage가 보다 크다고 생각되는 GOT:540, GPT:650의 medium severe의 病態群과 GOT 및 GPT 2,000以上の severe 病態群에서는  $K_1$ 값이 더욱 작아짐을 알 수 있다. 即 肝機能의 損傷이 클수록 first phase에서 plasma로부터 liver의 uptake가 저해를 받고 있으며 plasma clearance retention time이 길어짐을 알 수 있다. 이것은 Richards<sup>14)</sup> 등이 報告한

BSP의 plasma concentration 變化的 結果와 一致한다.

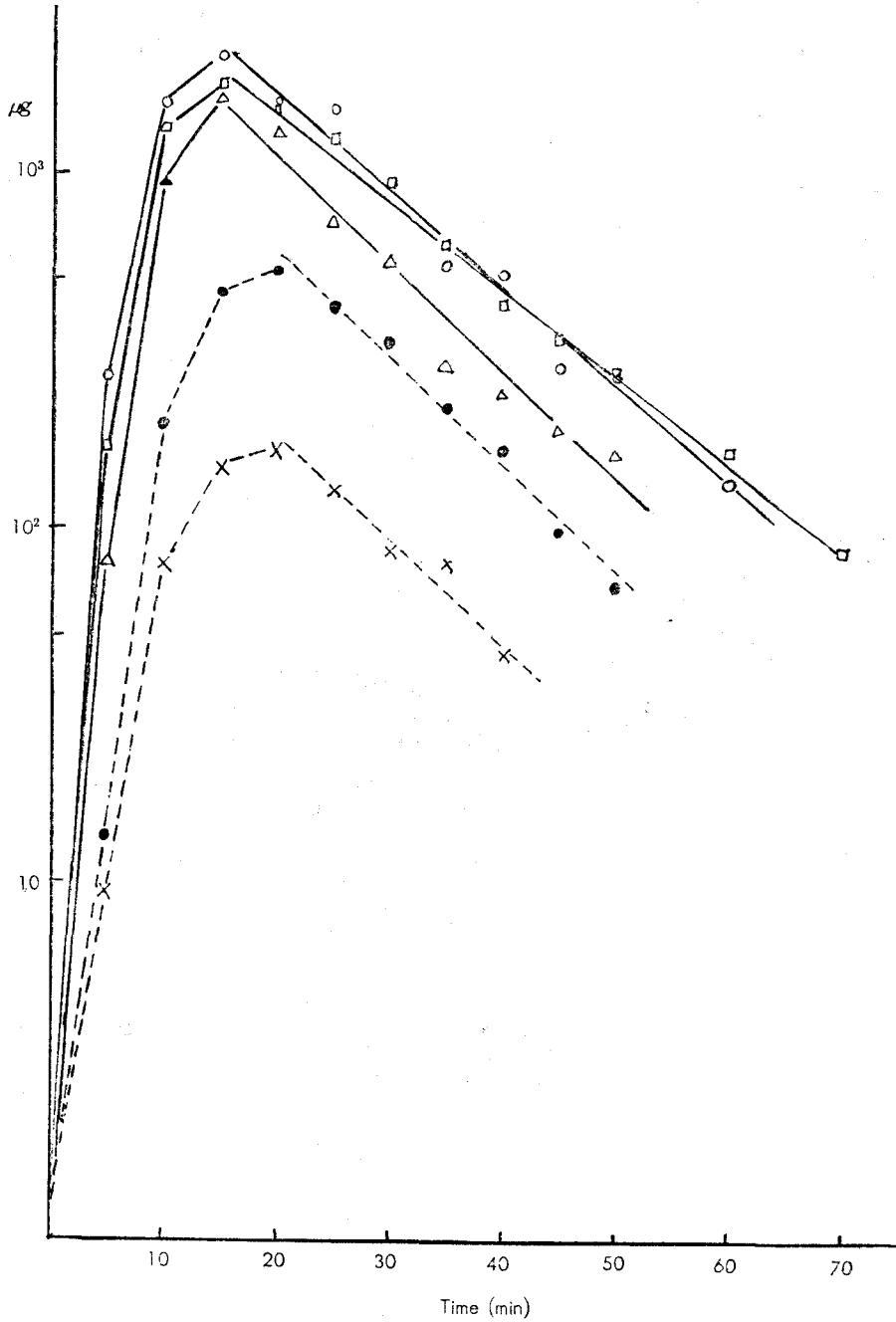


Figure 2—Biliary excretion of BSP in normal and disease states.  
Key : —□—, —○—, —△—, Normal ;  
    ...●..., ...×..., Disease.

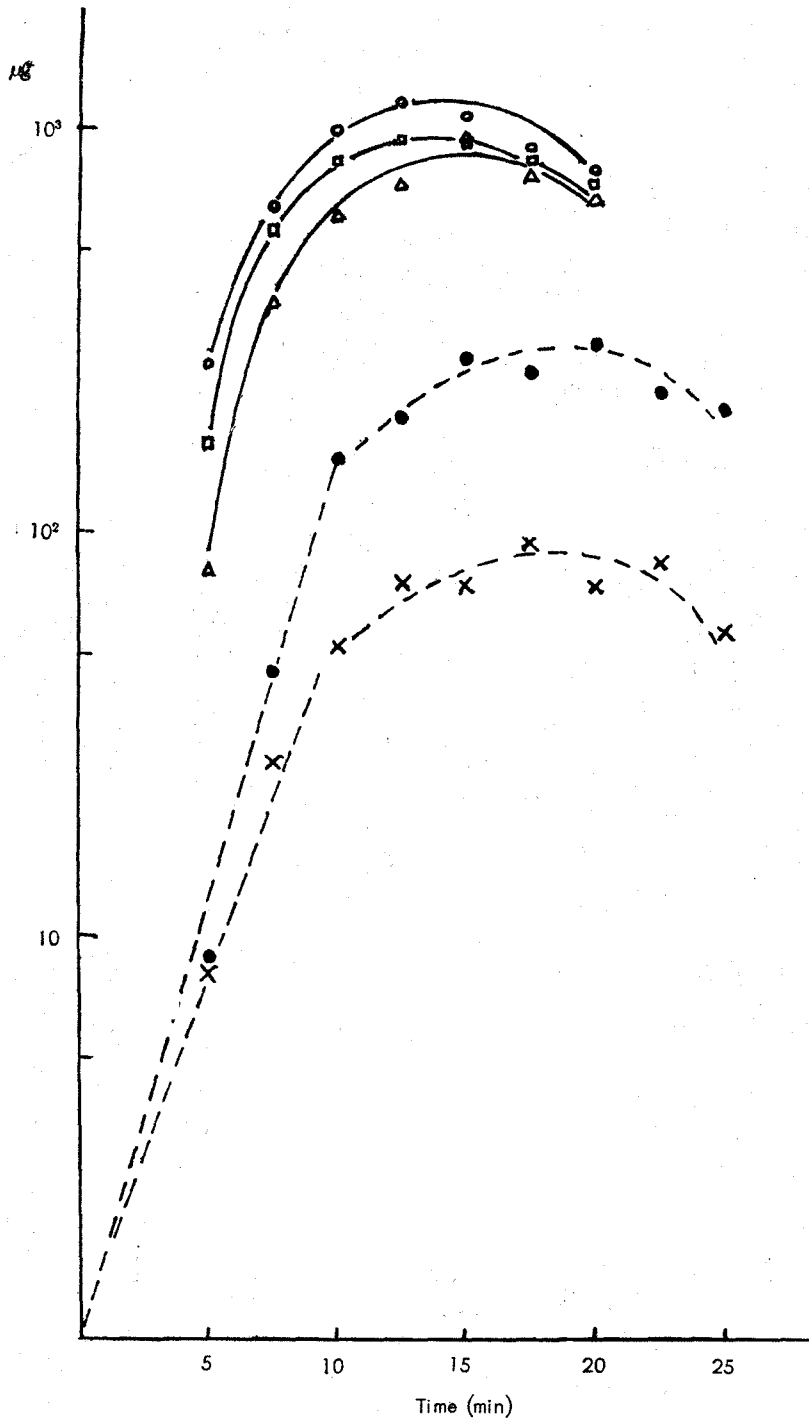


Figure 3—Biliary excretion of BPB in normal and disease states at max. level.

Key : —□—, —○—, —△—, Normal ;  
 ...●..., ...×..., Disease.

Fig. 2는 正常群과 CCl<sub>4</sub> intoxicate된 病態群에서 담즙을 5분간격으로 sampling하여 BPB 담즙배설을 semilogarithmic plot한 것이다.

正常群에서는 BPB 정맥주사後 15분만에 담즙배설이 極大였고 그 量은 1500~1800 $\mu$ g/5min 였다. 極大인 15分以後에는 담즙배설이 first-order임을 알 수 있다. CCl<sub>4</sub> intoxicate된 病態群에서도 담즙배설의 極大時間은 20分으로 延長되고 그 量은 170~50 $\mu$ g/5min로 正常群보다 훨씬 감소하였으나 그 後 담즙배설은 正常群과 비슷한 기울기의 first-order였다. 正常群과 病態群의 담즙배설양상을 比較하기 爲해 Fig. 3에서 2.5分 간격으로 담즙배설량을 sampling 하여 확대하였다.

正常群은 12.5分에서 極大를 갖고 완만한 曲線을 나타냈으나 病態群은 17.5分~20分 사이에서 비슷한 極大值를 가지며 bend<sup>14)</sup>의 시간범위가 길었다. 이는 intracellular transport 또는 liver parenchymal cell로부터 bile canaliculi로의 배설中 어느 process에 依하여 영향을 받는 것인지는 앞으로 究明해야 할 것이다.

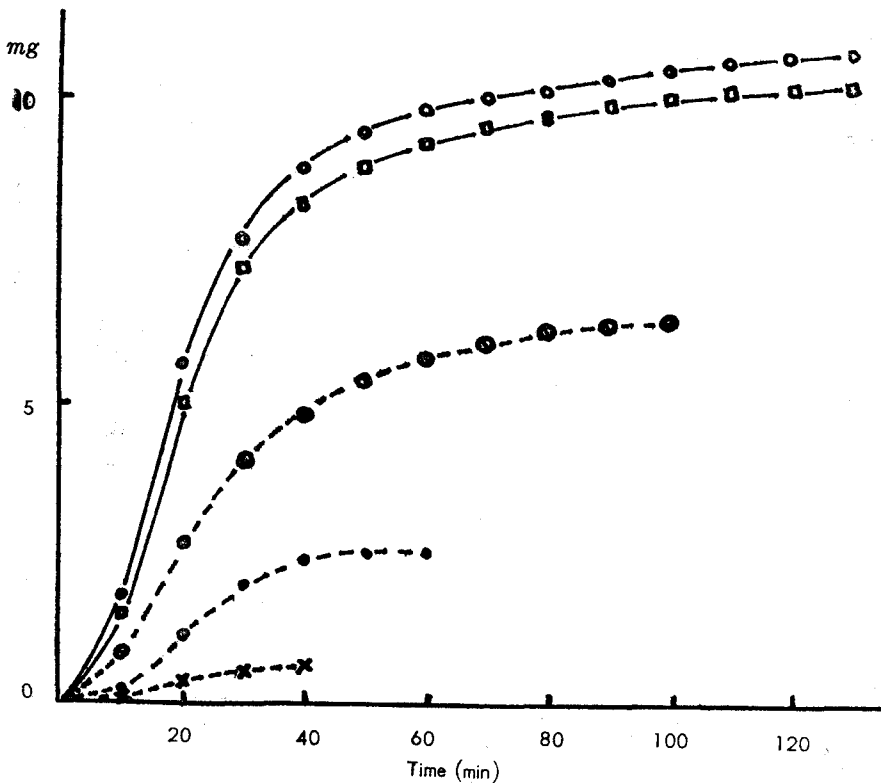


Figure 4—Cumulative biliary excretion curves of BPB in normal and disease states.

- Key : —○—, —□—, Normal;  
 ...○... (GOT; 540, GPT; 650)  
 ...●... (GOT; over 2000, GPT; over 2000)  
 ...×... (GOT; over 2000, GPT; over 2000), Disease.

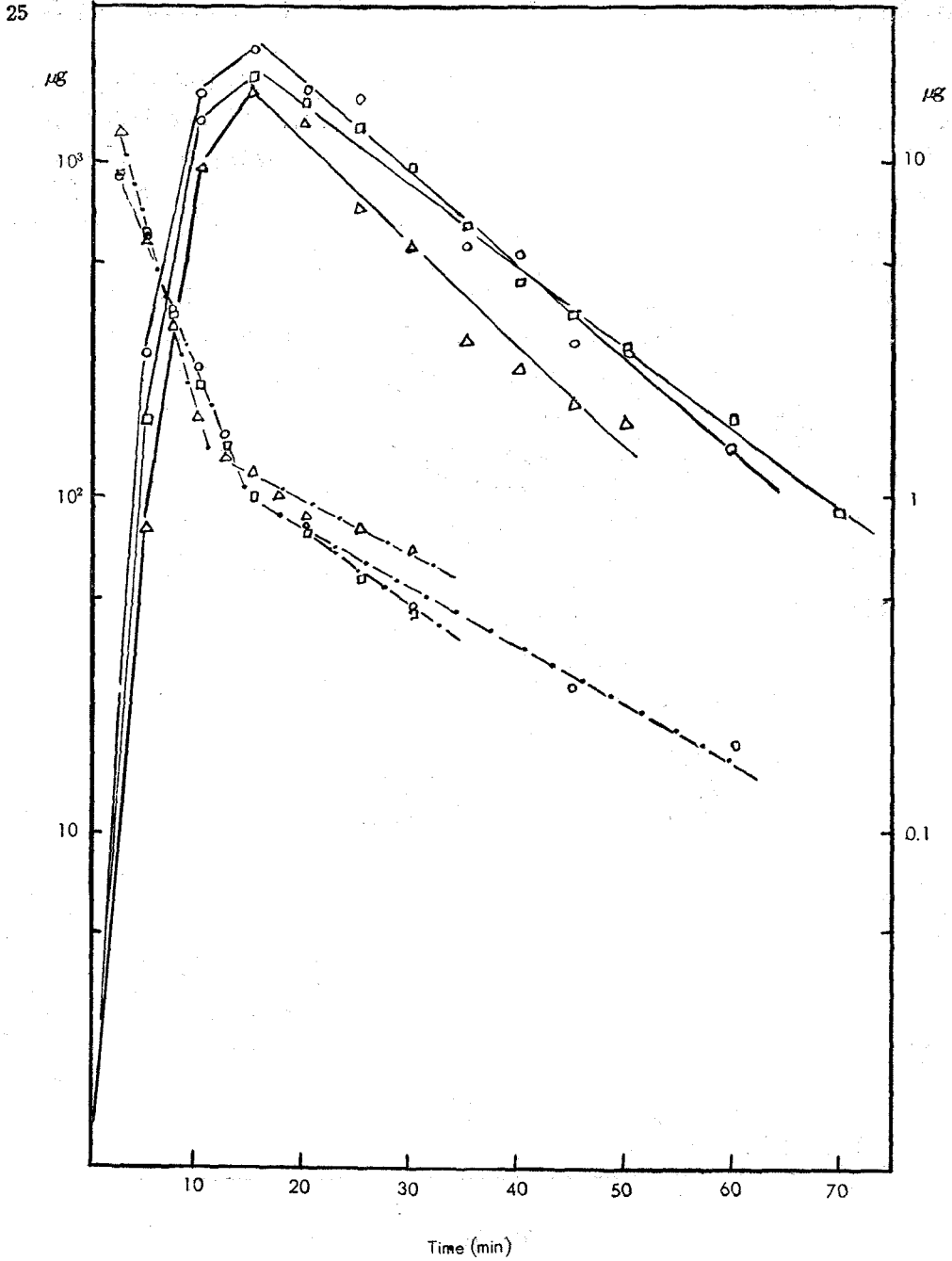


Figure 5—Plasma concentration and biliary excretion curves of BPB in normal State.

Key :  $\begin{matrix} \text{---}\triangle\text{---} \\ \text{---}\circ\text{---} \\ \text{---}\square\text{---} \end{matrix}$  } plasma concentration curve ;  
 $\begin{matrix} \text{---}\square\text{---} \\ \text{---}\triangle\text{---} \\ \text{---}\circ\text{---} \end{matrix}$  } biliary excretion curve.



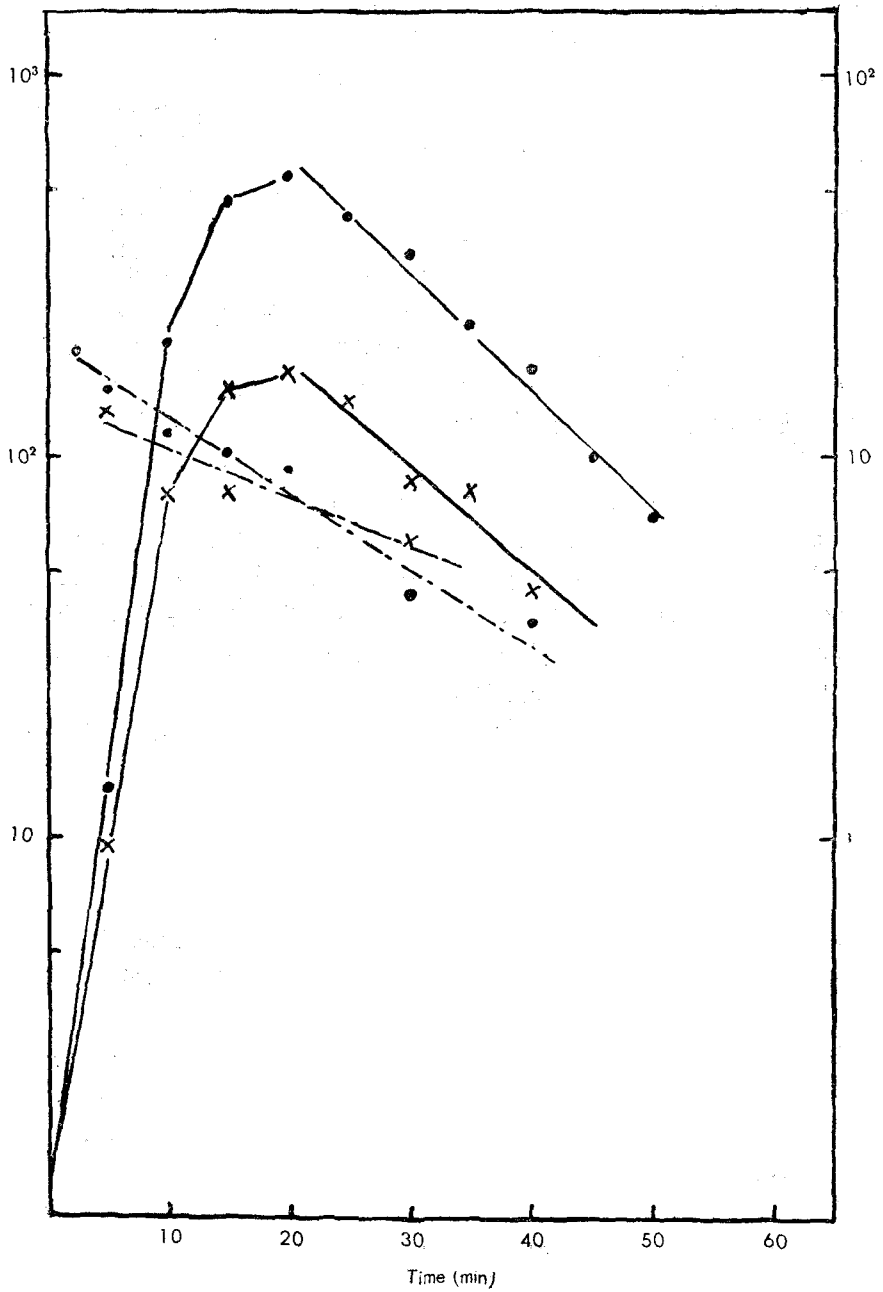


Figure 6—Plasma concentration and biliary excretion curves of BPB in disease state.

Key :  $\cdots \bullet \cdots$  } plasma concentration curve ;  
 $\cdots \times \cdots$  }  
 $\cdots \bullet \cdots$  } biliary excretion curve.  
 $\cdots \times \cdots$  }

Fig. 4에서 BPB 담즙배설 누적량은 正常群에서 60분까지 BPB 注射量の 62%가 배설되었으나 GOT: 540, GPT: 650인 medium severe에서는 37% 배설되었고 GOT 및 GOT 값이 2000以上の severe 病態群에서는 15% 배설되었다. 이와 같이 肝의 damage가 심할수록 BPB의 담즙배설량이 감소함을 알 수 있다. 正常群에서의 BPB 배설누적량은 2時間以後 plateau에 到達하며 BPB<sup>1</sup>/BPB<sup>2</sup>의 값(BPB<sup>1</sup> 및 BPB<sup>2</sup>는 1時間 및 2時間의 BPB 배설누적量)은 0.92였다. Takade<sup>16)</sup> 등이 rat에서 BPB<sup>1</sup>/BPB<sup>2</sup>의 값은 0.65로 報告한 것과는 差異가 있으며 이는 種差에 依한 것으로 생각된다. medium severe 病的 狀態에서의 BPB<sup>1</sup>/BPB<sup>2</sup> 값은 0.94로 누적速度는 差異가 거의 없음을 나타내고 있다.

Fig. 5는 正常群에서 BPB의 血中濃도와 담즙농도의 經時變化를 함께 plot한 것이고 Fig. 6은 病的狀態群의 그것을 plot한 것이다. 正常群의 血中濃度變化和 담즙中배설에서 bend는 相對的인 傾을 나타내나 病態群의 血中濃度變化에서 bend가 나타나지 않으며 Fig. 3에서 bend의 時間범위가 길어지는 것과 相關이 있는 것으로 생각된다. 病態에서 bend가 나타나지 않는 것은 BSP의 담즙中 배설에서 biliary obstruction일때 first phase의 값이 떨어지는 것으로 說明될 수 있다.<sup>16)</sup>

Iga<sup>8)</sup> 등은 ① hepatic blood flow, ② binding to plasma proteins, ③ permeability across the sinusoidal plasma membrane, ④ interaction with cytoplasmic binding proteins X, Y, Z, ⑤ metabolism, ⑥ permeability across the bile canalicular membrane, ⑦ bile flow and transport in the bile duct를 열거하였으며 Levi<sup>17)</sup> 등은 Y-protein(Ligandin)과 Z-protein이 많은 有機 anions의 plasma로부터 liver로의 수송에 重要한 cytoplasmic organic anion binding protein이라 提示하였다.

이 實驗結果는 病的狀態에서의 drug disposition에 미치는 영향에 관한 情報를 提供해 줄수 있을 것으로 思料된다.

## 結 論

1) CCl<sub>4</sub> intoxicated rabbits에서는 正常群보다 BPB의 plasma clearance의 현저한 retention이 나타났고, plasma curve의 first-phase의 기울기는 liver damage가 클수록 더 감소하였다.

2) 正常群과 CCl<sub>4</sub> intoxicated 群의 BPB biliary excretion의 pattern은 類似하였으나, 담즙중 배설된 BPB量은 CCl<sub>4</sub> intoxicated 群에서 훨씬 감소하였다.

3) 正常群에서는 BPB의 plasma disappearance와 biliary excretion pattern의 상대성을 발견할 수 있었다.

## 參 考 文 獻

- 1) L. Z. Benet, "The Effect of Disease States on Drug Pharmacokinetics" Am. Pharm. Assoc. (1976).
- 2) B. Combes, *Science*, **129**, 388 (1959).
- 3) K. Takada, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 922 (1974).

- 4) I.M. Arias, *J. Clin. Invest.*, **48**, 2156 (1969).
- 5) B. Combes, et al., *J. Lab. Clin. Med.*, **75**, 542 (1970).
- 6) W.B. Jakoby, *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130 (1974).
- 7) W.H. Habig, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **71**, 3879 (1974)
- 8) T. IGA, et al, *Biochem. Pharmac.*, **26**, 1867 (1977).
- 9) A. Suyama, et al., *J. Pharm. Dyn.*, **2**, 105 (1979).
- 10) 金井宗, 金井正光, 臨床検査法提要, 金原出版 p. VII-101 (1975)
- 11) Mateler, et al., *J. A. M. A.* **121**, 723 (1943).
- 12) G. Giorg, and G. Segre. *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **1**, 217 (1973)
- 13) C.D. Klaassen and G.L. Plaa, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **12**, 132 (1968).
- 14) T.G. Richards, V.R. Tindau and A. Young, *Clin. Sci.*, **18**, 499 (1959).
- 15) K. Takada, et al., *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **2**, 495 (1974).
- 16) H. Reyes. et. al., *J. Clin. Invest.*, **50**, 2242 (1971).
- 17) Levi, et. al., *J. Clin. Invest.*, **48**, 2156 (1969).